Н.А. Волкова, Т.Ф. Петренко, Е.И. Гончарук, В.И. Грищенко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

КРИОКОНСЕРВИРОВАННАЯ СУСПЕНЗИЯ КЛЕТОК ХОРИОНА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ РЕСУРС ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Введение

Если рассматривать вопрос широко, надо признать, что сохранение здоровья каждого члена человеческой популяции является вкладом в сохранение генетических ресурсов человечества в целом. На сегодняшний день мы наблюдаем в медицине активное применение биотехнологических методов, в частности, клеточной терапии. Создающиеся хранилища аутологичной крови, стволовых клеток и специализированных клеток имеют очевидное отношение к сохранности генетического материала человека [1].

Одним из новых материалов для биотехнологии является ткань хориона. Перспективность использования хориальной ткани заключается в том, что она является полифункциональной в эндокринном и иммунологическом отношении, секретирующей хорионический гонадотропин, соматотропин, прогестерон, репродуктивные иммуномодуляторы, цитокины, интерлейкины, в частности, ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6 и др. [2, 3]. Наряду с большим спектром биологически активных веществ ткань хориона содержит клетки-предшественники различной степени дифференцировки [4, 5].

Целью нашей работы было получение, криоконсервирование и оценка функциональной активности суспензии клеток хориона.

Материалы и методы

В экспериментах использован утильный материал (6-9 недель гестации), полученный в результате легальных абортов от здоровых женщин с их добровольного согласия после консилиумного решения врачей. Материал был проверен на отсутствие инфицирования методом ПЦР, бактериальной обсемененности рутинными методами. Ворсинчатую часть ткани хориона подвергали ферментативной дезагрегации [6]. Полученную суспензию криоконсервировали по 3-х этапной программе с последующим хранением в жидком азоте [7]. В качестве криопротекторов использовали ДМСО, 1,2 пропандиол (1,2 ПД), глицерин, оксиэтилированный глицерин (ОЭГ) [8]. Криоконсервированные образцы отогревали на водяной бане. В нативных и деконсервированных образцах проводили оценку количества жизнеспособных клеток при помощи трипанового синего, содержание CD 34^{+} клеток и их жизнеспособность (тест набор 7AAD) определяли методом проточной цитофлюориметрии на приборе FACS Calibur фирмы Becton-Dickinson (США) с использованием реагентов Becton-Dickinson. В нашем распоряжении были моноклональные антитела CD34^{+}PE (клон 2D1). Также исследовали функциональную активность митохондрий при помощи флуоресцентного зонда JC-1 методом люминесцентной микроскопии. Статистическая обработка полученных результатов проводилась по методу Стьюдента-Фишера. Достоверными считали значения при $p<0,05$.

Результаты

Первым этапом работы было отработка метода получения суспензии клеток хориона с максимальным числом жизнеспособных клеток. Методы механической дезагрегации приводят к получению суспензий с низким выходом жизнеспособных клеток (35±7%), поэтому альтернативой является ферментативная дезагрегация. При использовании раствора трипсина (0,25%) суспензия клеток хориона имела жизнеспособность 90±6%, при использовании раствора колагеназы (0,1%) - 50±7%, сочетание растворов трипсина и Версена – 87±6%. Максимально эффективным было сочетание растворов трипсина и коллагеназы, когда количество жизнеспособных клеток хориона составила 94±5%.

Криоконсервирование клеток хориона в среде без криопротектора приводит к гибели большей части клеток. Нами были проведены эксперименты по подбору наиболее часто используемых в практике криопротекторов и их концентраций для исследуемого объекта. Полученные результаты представлены в таблице. Как показывают полученные результаты, добавление в среду криоконсервирования 10% ДМСО приводит к сохранению максимального числа жизнеспособных клеток. Защитные свойства рассмотренных криопротекторов для клеток хориона можно расположить в следующей последовательности: 10% ДМСО > 10% глицерин > 5% оксиэтилированный глицерин > 5% 1,2 ПД. Различная эф-

Жизнеспособность криоконсервированной суспензии клеток хориона (n=10, M±m)

Криопротектор	Жизнеспособность, %
Контроль (без криопротектора)	16±3
ДМСО, 5%	79±4*
ДМСО, 10%	88±3*
ДМСО,15%	61±7*
ДМСО, 20%	35±4*
1,2 ПД 5%	32±7*
1,2 ПД 10%	20±4
1,2 ПД 15%	14±6
1,2 ПД 20%	5±2*
Глицерин, 5%	70±7*
Глицерин, 10%	75±5*
Глицерин,15%	58±3*
Глицерин, 20%	18±5
ОЭГ 5%	55±6*
ОЭГ 10%	48±8*
ОЭГ 15%	40±3*
ОЭГ 20%	36±5*

Примечание: * - достоверно относительно контрольных значений $p<0,05$

фективность в использовании рассмотренных криопротекторов обусловлена особенностями их механизмов действия, а так же различной клеточной проницаемостью. Так, несмотря на то, что ДМСО и 1,2 ПД относят к группе проникающих криопротекторов, механизмы их защитного действия отличаются.

В свежевыделенной суспензии клеток хориона содержания CD 34^+ составило 3,9±0,4% с жизнеспособностью 95±3%. Криоконсервирование клеточной суспензии под защитой 10% ДМСО не приводило к существенному снижению рассматриваемых показателей: содержание CD 34^+ - 3,4±0,2% с жизнеспособностью 87±5%.

Одним из тестов, характеризующим функциональное состояние клетки является тест на взаимодействие внутренних мембран митохондрий клетки с потенциал-зависимым флуоресцентным красителем JC-1. По наблюдаемому свечению клетки можно судить об интенсивности синтетических процессов в клетке. При окрашивании нативной суспензии хориона зондом JC-1 наблюдали красное свечение клеток хориона. Криоконсервирование не приводило к изменению характера свечения в клетках хориона.

Результатом наших исследований явилось получение перспективного криоконсервированного препарата для биотехнологии, характеризующегося высокой жизнеспособностью клеток, содержанием клеток-предшественников, а так же сохранностью структур митохондрий. Кроме того, имеются новые перспективы в использовании клеточного материала в репаративно-регенеративных процессах организма посредством трансплантации органелл клетки и восстановлении утраченных функций конкретных клеток организма. После появления работ Центра генной терапии [9], где доказательно был показан митохондриальный перенос от неповрежденных стволовых клеток и фибробластов в клетки-реципиенты с поврежденными митохондриями, вполне реальным является восстановление функциональной полноценности клеток организма посредством сокультивирования с клетками-донорами.

SUMMARY

In the research there are presented the results on obtaining and cryopreservation of chorion cells' preparation under DMSO, 1,2 propane diol, glycerol, oxyethylated glycerol protection. The obtained results testified that cryopreservation with 3-stage program in 10%DMSO presence enabled the saving a high percentage of viable cells, did not cause the change CD 34^+ cells content and preserved mitochondrial functional activity.

Литература

1. Грищенко В.И. Достижения и перспективы развития клеточной и тканевой терапии // Международный мед. журнал. 1999. № 4. С. 6-10.
2. Павлов О.В., Сельков С.А., Лалаян Д.В., Аржанова О.Н. Особенности секреции провоспалительных цитокинов ткани ворсинчатого хориона при невынашивании беременности // Бюл. экспер. биологии и медицины. 2003. № 4. С. 441-

444.
3. Куклина Е.М., Ширшев С.В, Шарова Н.И., Ярилин А.А. Влияние хорионического гонадотропина на дифференцировку тимоцитов в присутствии эпителиальных клеток тимуса // Онтогенез, 2003. Т. 34, № 1. С. 36-42.
4. Bailo M., Soncini M., Vertua E. et. al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta // Transplantation. 2004. V. 78, № 3. P. 1439-1448.
5. Trelford J.D., Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present // Am. J. Obstet. Genicol. 1979. V. 137, № 7. P. 833.
6. Патент № 74976 Украина. Гончарук Е.И., Петренко Т.Ф., Павленко О.В., Парфенова В.В., Грищенко В.И. Препарат для лечения ожогов на основе клеток хориона, способ его приготовления и способ лечения. Опубл. 15.02.2006. Бюл. № 2.
7. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С. и др. Клиническое применение криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека. Метод. рекомендации. Киев, 1991. 9 с.
8. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. Киев.: «Наукова думка». 1979. 100 с.
9. Spees J., Olson S., Whitney M. et. al. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103, № 5. P. 1283-1288.

УДК: 577.3; 57.043

Э.Н. Гахова, Т.Н. Пашовкин, Е.В. Мельникова, В.К. Утешев, Д.Г. Садикова
Институт биофизики клетки РАН

УЛЬТРАЗВУК МОЖЕТ ИЗМЕНЯТЬ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЗАРОДЫШЕВЫХ ОБОЛОЧЕК АМФИБИЙ

Низкая проницаемость зародышевых оболочек гидробионтов для воды и криопротекторов является одной из основных причин отсутствия успехов при криоконсервации зародышей. Зародышевые оболочки можно удалить механическим, микрохирургическим или ферментативным способами. Однако такие способы нарушают целостность зародышей. Это обстоятельство приводит к поиску более щадящих методов обработки зародышей с целью увеличения проницаемости оболочек для воды и криопротекторов. Одним из таких методов может служить воздействие на зародыши высокочастотного ультразвука, который, как известно, вызывает изменение проницаемости биологических мембран для целого ряда веществ (Pasechnik, Sokolov, 1973; Bundy et al., 1978; Rohr and Rooney, 1978; Пашовкин, 1981, 1998; Вишневский, 1990). Мы изучаем возможность изменения проницаемости зародышевых оболочек амфибий под воздействием непрерывного ультразвука при сохранении зародышами способности к развитию (Мельникова и др., 2005; Утешев и др., 2006).

В настоящей работе представлены данные о действии ультразвука на развитие зародышей амфибий (травяная лягушка *Rana temporaria*) и на проницаемость их зародышевых оболочек для флуоресцентных красителей.

Для обработки ультразвуком зародыши на стадии бластулы помещали в специально сконструированную камеру. Источником ультразвука служила установка УЗТ-1.026. Частота ультразвука составляла 0,88 МГц, или 2,64 МГц. Интенсивность ультразвука варьировали от 0,05 Вт/см^2 до1,0 Вт/см^2. Длительность воздействия изменяли в разных сериях эксперимента от 1 до 15 минут.

Состояние зародышей после действия ультразвука оценивали по числу зародышей, выживших до стадии выклева. Об изменении проницаемости зародышевых оболочек после обработки ультразвуком судили по наличию флюоресценции в межклеточном пространстве и/или в клетках зародышей после флуорохромирования в растворах 1-анилино-8-нафталино сульфоната (АНС), флуоресцеиндиацетата (ФДА), или флуоресцеина (Ф). Для визуальной оценки и регистрации использовали модифицированный люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-ИЗ (ЛОМО, Россия). Контролем служили флуорохромированные зародыши амфибий, не подвергавшиеся воздействию ультразвука.

Действие ультразвука на развитие зародышей амфибий. Как можно видеть на рис. 1, в контроле лишь 66% зародышей, отобранных на стадии бластулы, достигали стадии выклева. После воздействия ультразвуком с частотой 0,88 МГц и интенсивностью 0,05 Вт/см^2 число развивающихся до выклева зародышей увеличивалось: пос-